

PAT-NO: JP360188096A
DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 60188096 A
TITLE: METHOD FOR MEASURING TOTAL AMOUNT OF POLYAMINE
PUBN-DATE: September 25, 1985

INVENTOR-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
ISOBE, KIMIYASU	
MATSUNAGA, KUNIYOSHI	
YAMADA, HIDEAKI	
OTSUJI, SEIGO	

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
AMANO PHARMACEUT CO LTD	N/A

APPL-NO: JP59045279
APPL-DATE: March 8, 1984

INT-CL (IPC): C12Q001/26 , G01N033/50

US-CL-CURRENT: 435/25

ABSTRACT:

PURPOSE: To measure the total amount of polyamines in a sample reading and simply with a high accuracy, by pretreating the sample containing various polyamines with a polyamine oxidase, and reacting the pretreated sample with an amine oxidase.

CONSTITUTION: Spermine in a sample containing various polyamines is first converted into spermidine and/or putrescine with a polyamine oxidase, and hydrogen peroxide formed in the process is completely removed by the conventional method. An amine oxidase capable of acting on the spermidine, putrescine and cadaverine to produce equimolar amount of hydrogen oxide without producing the putrescine from the spermidine is reacted with the above-mentioned sample to color and determine colorimetrically the produced hydrogen peroxide.

COPYRIGHT: (C)1985,JPO&Japio

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭60-188096

⑮ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和60年(1985)9月25日

C 12 Q 1/26
G 01 N 33/50

8213-4B
E-8305-2G

審査請求 未請求 発明の数 1 (全8頁)

⑭ 発明の名称 総ポリアミン量の測定法

⑯ 特 願 昭59-45279

⑰ 出 願 昭59(1984)3月8日

⑱ 発 明 者	磯 部	公 安	江南市藤ヶ丘5-1-4 江南団地84-409
⑱ 発 明 者	松 永	國 義	一宮市丹陽町五日市場71番地の2
⑱ 発 明 者	山 田	秀 明	京都市左京区松ヶ崎木ノ本町19-1
⑱ 発 明 者	尾 辻	省 悟	鹿児島市小松原1-37-10
⑰ 出 願 人	天野製薬株式会社		名古屋市中区錦1丁目2番7号

明 細 書

1. 発明の名称

総ポリアミン量の測定法

2. 特許請求の範囲

各種ポリアミン含有試料をポリアミン酸化酵素で処理し、試料中のスベルミンをスベルミジンおよび/又はブトレツシンに変換せしめるとともにその際生成する過酸化水素を消去した後、更にスベルミジン、ブトレツシン及びカダベリンに作用する酸化酵素を添加し、反応させ、生成する過酸化水素を定量することによって試料中のポリアミン量を求めることを特徴とする総ポリアミン量の測定法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、酵素法による試料中の総ポリアミン量の迅速、簡便かつ精度のよい測定法に関するものである。

ポリアミンは、生物界に広く分布する非蛋白性低分子量の脂肪族塩基性化合物で、細胞の分裂、増殖及びその生化学的背景をなす核酸の代謝に重

要な役割を果たしている物質として知られている。

哺乳動物の生体中では、スベルミン、スベルミジン、ブトレツシン、カダベリンが主として存在しており、これらをまとめて総ポリアミンと称している。

近年、癌患者の尿中、血中、リンパ液中などのいわゆる体液中の総ポリアミン量が正常人に比して著しく増加することならびに治療によって総ポリアミン量が減少することが報告されている。

従って、臨床検査において癌の診断、癌の治療効果の判定及び予後の診断等において総ポリアミン量の測定が有効な手段となりつつある。

従来、総ポリアミン量の定量法としては、ガスクロマトグラフィーによる方法〔クリニカル・ケミストリー (Clin. Chem.) 第19巻、第 904~907 頁 (1973)〕、アミノ酸分析計による方法〔フェブス・レターズ (FEBS Lett.) 第46巻、第 305~307 頁 (1974)〕、高速液体クロマトグラフィーによる方法〔ジャーナル・オブ・クロマトグラフィー (J. Chromatography) 第 145巻、第 141~146

頁(1978)などの化学的方法が主として用いられていた。しかしながらこれら化学的方法は、迅速性に欠ける上に、処理操作が極めて煩雑で多くの検体を処理できず、又特殊な機器、設備等を必要とするため、一般臨床検査への応用は困難であった。一方、最近酵素を用いる総ポリアミン量の測定法も提案された(特公昭56-36918号、特開昭59-2700号、特開昭58-141798号及び特開昭58-146297号)。このうち特公昭56-36918号方法は、遊離型ポリアミン含有試料に発芽大豆由来のアミノキシダーゼを作用させ、生成する過酸化水素を発色させ、比色定量する方法であり、特開昭59-2700号方法は、遊離型及び抱合型ポリアミン含有試料にあらかじめアスコルビン酸オキシダーゼを作用させて反応阻害物質の影響を除去したのち、発芽大豆由来のアミノキシダーゼを作用させ、生成する過酸化水素を発色させ、比色定量する方法である。

しかしながら、これら酵素法による総ポリアミン量測定法はいずれも次のような欠点を有してい

ることが判明した。

これら酵素法は、発芽大豆由来のアミノキシダーゼを用いており、この発芽大豆のアミノキシダーゼはスベルミンを基質とするとき1モルのスベルミンより2モルの過酸化水素を生成するが他のポリアミン即ちスベルミジン、プトレッツシン及びカダベリンからは1モルの過酸化水素を生成するので試料中の総ポリアミン量を求める場合、酵素反応の結果生ずる過酸化水素の総量を比色定量するのであるが、これらいずれの方法ともスベルミンに関して真の値より高い値が得られることとなりその結果これらの方法は正確性に欠けることになってしまう。特にスベルミン含量の多い血液を試料として臨床検査に用いる場合にはこれら酵素法による総ポリアミン測定法は誤差が大きくなって使用不可能であった。

又、発芽大豆由来のアミノキシダーゼは植物性の酵素であり、微生物由来の酵素に比して大量生産出来にくく、そのため臨床検査において大量に使用する場合、コスト的にも問題を有していた。

一方特開昭58-141798号方法はポリアミン溶液にミクロコッカス・フラビダスのプトレッツシンオキシダーゼを用いるポリアミンの分析法であるが、このプトレッツシンオキシダーゼは主としてプトレッツシン、カダベリン、スベルミジンに作用する酵素であり、総ポリアミンのうちスベルミンには作用せず血液を試料として用いられないという欠点があり、更に特開昭58-146297号方法はペニシリウム属の産生するポリアミノキシダーゼMを用いて試料中のスベルミン、スベルミジン、アセチルスベルミン及びアセチルスベルミジンからなる総ポリアミンの定量法であるが、このポリアミノキシダーゼMはプトレッツシン及びカダベリンには作用しないこと及びスベルミンに作用して1モルのスベルミンから2モルの過酸化水素を生成すること等のためこの方法もやはり正確な総ポリアミン量の測定方法とはなり得ないものであった。

そこで本発明者らは、これら事情に鑑み、従来の総ポリアミン量測定法に比較して迅速にしてより正確で精度のよい酵素法による総ポリアミン量

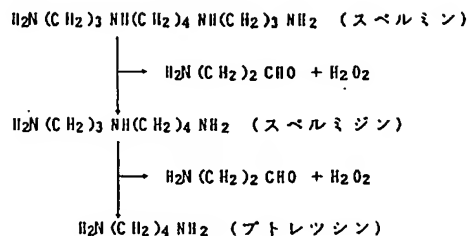
の測定法を開発すべく鋭意検討を重ねた。その結果、各種ポリアミンを含有する試料中のスベルミンをまずポリアミノキシダーゼによってスベルミジンおよび/又はプトレッツシンに変換せしめ、かつその際生成する過酸化水素を消去した後、次いでスベルミジン、プトレッツシン、カダベリンに作用し、かつスベルミジンからプトレッツシンを生成しないアミノ酸化酵素を添加し、反応させ、その際生成する過酸化水素を発色させ、比色定量することによって総ポリアミン量を求めればこの方法においては試料中のスベルミンと等モル量の過酸化水素が生成される結果、迅速にして正確な総ポリアミン量の測定が可能となることを知り、本発明を完成したものである。

本発明方法の特徴の1つは試料中の総ポリアミン量を酵素を用いて測定するに当り、前処理反応を施すことにある。

すなわち前処理反応として、あらかじめ総ポリアミンを含有する試料にポリアミノ酸化酵素を作用させ、試料中のスベルミンを式1に従って等モ

ルのスベルミジンおよび／又はブトレツシンに変換してしまう。

式 I



上記の前処理時に得られる反応生成物は必ずしも一定のものが得られるのではなく、温度・pH等の条件により異なった状態のものが得られる。すなわちスベルミンがスベルミジンを経てブトレツシンまで完全に分解される場合、スベルミンがスベルミジンに分解されそこで止まってしまう場合及びスベルミンからスベルミジンを経てスベルミジンの一部がブトレツシンに分解される場合（この場合はスベルミジンとブトレツシンの混合物が

得られる）等である。本発明においてはこれらいずれの場合においても次なる第2の反応に使用され得るが、公知のブトレツシン酸化酵素を用いる場合には反応性を考慮するとスベルミンが完全にブトレツシンに変換される場合がより好ましい。

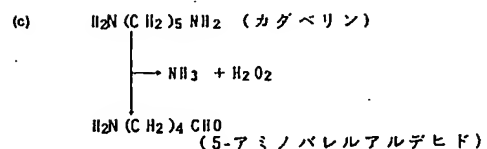
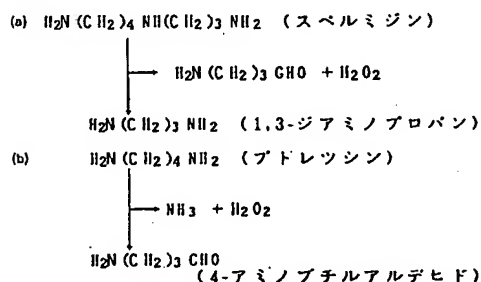
次いで、上記の前処理反応の結果、生成した過酸化水素を消去してしまうことも本発明法の2番目の特徴である。この理由は前処理段階で生成した過酸化水素が残存すると次なる反応に影響を与え測定誤差の要因となるので、この段階で生成される過酸化水素は完全に除去されねばならない。そのための方法として、カタラーゼを添加し過酸化水素を分解してしまう方法、或いはペルオキシダーゼの存在下、過酸化水素と反応する色原体の一つと反応させる方法等の一般的な過酸化水素除去方法が利用され得る。

こうした前処理反応によってスベルミンは等モルのスベルミジンおよび／又はブトレツシンに変換させられてしまう。その後、総ポリアミンの定量法を行うのである。すなわちスベルミジン、

ブトレツシン及びカダベリンからなるポリアミン混合試料にスベルミジン、ブトレツシン及びカダベリンを分解する能力を有し、かつスベルミジンからブトレツシンを生成しないアミン酸化酵素を作用させることによってスベルミジン、ブトレツシン及びカダベリンよりそれぞれ等モルの過酸化水素が生成する。そこで、該過酸化水素を発色させ比色定量することによって総ポリアミン量を求めるものである。

以下にこれらの第2の反応に用いるアミン酸化酵素の反応式の1例を式II(a)～(c)にて示す。

式 II



上記の反応式II(a)、(b)、(c)において用いられるアミン酸化酵素はスベルミジン、ブトレツシン、カダベリンに作用して等モルの過酸化水素を生成するものであればいずれにても用いられ得る。

次に参考例、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、ポリアミン酸化酵素と第2の反応に用いるアミン酸化酵素活性、ペルオキシダーゼ活性及びカタラーゼ活性測定法について述べる。なおポリアミン酸化酵素及びアミン酸化酵素の活性単位の変示は以下のように測定して、1分間に1 μmol の過酸化水素を生成するに要する酵素量をもって1単位として定めたものである。

(i) ポリアミン酸化酵素

0.1Mリン酸緩衝液 (pH6.5) 100mlに4-アミノアンチピリン10mg、フェノール 0.2ml、

ペルオキシダーゼ（ペーリンガー社製、グレードII）5mgを溶解し、発色液を調製する。

この発色液 1.5mlと10mMスベルミン 0.5mlとの混合物を35℃で3分間予熱したのち、酵素液 0.5mlを添加し反応させる。そして 505nmにおける発色の分子吸光係数として6250を用い、生成する過酸化水素に起因する 505nmの吸光度変化量（反応開始1分間の ΔA ）より酵素活性を求める。

(2) 第2の反応に用いるアミン酸化酵素

代表的な1例としてブトレツシン酸化酵素の活性測定を示すと次のようである。

基質として10mMブトレツシン 0.5ml及び発色液の緩衝液としてpH 8.5のリン酸緩衝液を用いる以外は(1)と全く同様にして酵素活性を求めた。

(3) ペルオキシダーゼ活性はピログロール、過酸化水素を基質とし、pH 6.0、20℃反応において20秒間に1mgのブルプロガリンを生成する酵素量を1単位とした。

(4) カタラーゼ活性は過酸化水素を基質とし、pH

7.0、25℃反応において1分間に1 μ molの過酸化水素を分解するに要する酵素量を1単位とした。

参考例1

4-アミノアンチピリン 7.5mg、ペルオキシダーゼ 350単位を 0.2Mリン酸緩衝液 pH 7.1の 100mlに溶解し、発色液Iとした。

(A) 発色液I 1.35mlにスベルミン溶液 100nmol (1.60ml)を添加し、30℃、3分間予熱後、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルフォプロピル)-m-トリイジンナトリウム塩（以下T.O.O.Sと略す）0.45mgとポリアミン酸化酵素AT-1（特開昭56-92788号公報記載）0.15単位（50 μ l）を添加した。30℃で10分間反応後、555nmの吸光度を測定した。（吸光度A）

(B) 発色液I 1.35mlにスベルミン溶液 100nmol (1.50ml)を添加し、30℃、3分間予熱後、T.O.O.S 0.45mgを含むポリアミン酸化酵素AT-1 0.15単位（50 μ l）を添加した。30℃で10分間反応後、0.65M NaOH溶液（0.1ml）を添加し、（この

pHにおいてはポリアミン酸化酵素は作用せず、ブトレツシン酸化酵素は作用しやすくなる。）、次いでブトレツシン酸化酵素（アグリカル・ケミストリー（Agric. Biol. Chem.）第30巻、第1202頁（1966）に準じて調製した。）4.5単位（10 μ l）を添加し30℃、10分間反応後 555nmの吸光度を測定した。（吸光度B）

(C) 発色液I 1.35mlにスベルミン溶液 100nmol (1.20ml)とカタラーゼ20単位（0.2ml）を添加し、30℃で3分間予熱後、ポリアミン酸化酵素AT-1 0.15単位（10 μ l、T.O.O.Sは含まない）を添加した。30℃で10分間反応後、0.65M NaOH溶液 0.1mlと30mMアジ化ナトリウム 0.1mlを添加し、更にT.O.O.Sを含むブトレツシン酸化酵素 4.5単位（50 μ l）を添加した。30℃、10分間反応後 555nmの吸光度を測定した。（吸光度C）

上記の反応における吸光度は次の通りであった。
吸光度A = 1.109

（200 nmolの過酸化水素量にほぼ相当する）
吸光度B = 1.664

（300 nmolの過酸化水素量にほぼ相当する）

吸光度C = 0.552

（100 nmolの過酸化水素量にほぼ相当する）

反応Cにおいてポリアミン酸化酵素との反応液にT.O.O.S（0.45mg含有）溶液を添加した場合の吸光度は0.000であった。

すなわち、吸光度Aは反応Aでスベルミンが完全にブトレツシンに酸化され2モル量の過酸化水素が生成されたことを示す。吸光度Bは反応Bでスベルミンとポリアミン酸化酵素との反応によって2モル量の過酸化水素と1モル量のブトレツシンが生成し、次いでブトレツシンがブトレツシンオキシダーゼによって完全に酸化され、計3モルの過酸化水素が生成されたことを示す。吸光度Cは反応Cでポリアミン酸化酵素との反応によって1モル量のブトレツシンとともに生成した2モル量の過酸化水素を同時に添加されたカタラーゼによって完全に分解してしまい（この処理ののちアジ化ナトリウムの添加によりカタラーゼの活性を失活させる必要がある。）、次いで生成したブト

レツシンをブトレツシン酸化酵素で分解することにより1モルの過酸化水素量が生成されたことを示している。すなわち反応Cの方法では、スベルミンと等モルの過酸化水素が生成されることとなりこの過酸化水素のモル数がすなわち、試料中のスベルミンのモル数となっている。

参考例2

スベルミン 100 nmol の代わりにスベルミジン 100 nmolを用いて参考例1と同様の検討を行った結果は次の通りであった。

吸光度 A = 0.554

(100 nmolの過酸化水素量に相当)

吸光度 B = 1.112

(200 nmolの過酸化水素量に相当)

吸光度 C = 0.556

(100 nmolの過酸化水素量に相当)

尚、反応Cのポリアミン酸化酵素との反応液に T O O S (0.45mg含有) 溶液を添加した場合の吸光度は0.000であった。

すなわち、吸光度 A は反応 A でスベルミジンが

ポリアミン酸化酵素で完全に1モル量のブトレツシンに酸化され1モル量の過酸化水素が生成することを示し、吸光度 B は反応 B でスベルミジンがポリアミン酸化酵素によって酸化され1モル量の過酸化水素と1モル量のブトレツシンが生成し、該ブトレツシンから更に1モル量の過酸化水素の計2モルの過酸化水素が生成したことを示す。更に、吸光度 C は反応 C でスベルミジンがポリアミン酸化酵素との反応によって1モル量のブトレツシンとともに生成された1モル量の過酸化水素がカタラーゼで完全に分解され(この後カタラーゼはアジ化ナトリウムの添加により完全に失活される。)、次いで該生成ブトレツシンにブトレツシンオキシダーゼを反応させることによって1モル量の過酸化水素量のみが測定されたことを示す。すなわち、反応Cの方法をとることによってスベルミジンより等モルの過酸化水素が生成し、従って過酸化水素を定量すれば即、それが試料中のスベルミジン量となっていることがわかる。

参考例3

スベルミン 100 nmol 代わりにブトレツシン 100 nmol又はカグベリン 100 nmolを用いて参考例1と同様の検討を行った結果は次の通りであった。

	ブトレツシン	カグベリン
吸光度 A	0.000	0.000
吸光度 B	0.554	0.555
吸光度 C	0.553	0.554

すなわちポリアミン酸化酵素はブトレツシン、カグベリンを全く酸化せず、ブトレツシン酸化酵素によって分解され、等モル量の過酸化水素が生成することが示された。

参考例4

発色液 I 1.35mlと基質(スベルミン又はスベルミジン又はブトレツシン又はカグベリン)の各基質 100 nmol (1.50ml)のそれぞれに発色液 I 及び 0.65N NaOH溶液 (0.1ml)を添加し、30℃、3分間予熱後それぞれに T O O S 0.45mgを含むブトレツシン酸化酵素 4.5単位 (50μl)を添加した。30℃で10分間反応後 555nmの吸光度を測定した結果

は次の通りであった。

基質の種類	吸光度
スベルミン	0.000
スベルミジン	0.555
ブトレツシン	0.553
カグベリン	0.556

すなわち、ブトレツシン酸化酵素はスベルミンを全く基質としないがスベルミジン、ブトレツシン、カグベリンを酸化し、それぞれ等モル量の過酸化水素を生成することが示された。

参考例5

スベルミン又はスベルミジンの10~100 nmolを基質として用いて参考例1と同様の操作を行った結果は表-1に示される。

(以下余白)

表 - 1

基質量 (nmol)	スベルミジン		
	吸光度 A	吸光度 B	吸光度 C
	0.111	0.167	0.057
	0.223	0.333	0.113
スベルミン	吸光度 A	吸光度 B	吸光度 C
	0.444	0.664	0.222
	0.669	1.002	0.335
	0.887	1.335	0.442
スベルミジン	吸光度 A	吸光度 B	吸光度 C
	0.055	0.109	0.054
	0.110	0.222	0.109
	0.224	0.443	0.221
混合試料 A	吸光度 A	吸光度 B	吸光度 C
	0.331	0.669	0.333
	0.444	0.891	0.445
	0.553	1.114	0.554

すなわち、反応 C はスベルミン、スベルミジン各々 10~100 nmol の範囲でスベルミン、スベルミジン量に相当する量の過酸化水素を測定でき、非常に正確な総ポリアミン量が測定できることが示された。

参考例 6

10mM スベルミン、10mM スベルミジン、10mM プトレツシン、10mM カダベリンの各単独の試料、これら 4 種のポリアミンを各々 1 : 1 : 1 : 1 の比で混合した試料（混合試料 A）と 2 : 2 : 1 : 1 の比で混合した試料（混合試料 B）の 6 種類を基質として調製した。各基質（10 μ l）の各々に発色液 1 1.35ml と蒸留水 1.20ml、カタラーゼ 20 単位（0.2 ml）を添加し、30℃ で 3 分間予熱後ポリアミン酸化酵素 0.15 単位（10 μ l）を添加した。30℃、10 分間反応後 0.65M NaOH 溶液 0.1ml と 30mM アジ化ナトリウム 0.1ml を添加し、更に T O O S 0.45mg を含む プトレツシン酸化酵素 4.5 単位（30 μ l）を添加した。30℃ で 10 分間反応後 555nm の吸光度を測定した結果は次の通りであった。

基質の種類	吸光度
スベルミン	0.555
スベルミジン	0.553
プトレツシン	0.554
カダベリン	0.554
混合試料 A	0.557
混合試料 B	0.555

すなわち、各ポリアミンの単独液或いはいかなる混合液においても本方法が使用できることが示された。

参考例 7

発色液 A~d を下記の様に調製し、A~D のそれぞれ 1.35ml と基質（1.0mM スベルミジン又は 1.0mM スベルミン）0.10ml、30mM アジ化ナトリウム溶液 0.10ml、蒸留水 1.25ml を混合し、30℃ で 3 分間予熱した。この液にポリアミン酸化酵素 A T - 1 0.15 単位（50 μ l）を添加し、30℃ で 10 分間反応した。反応終了後、発色液 A~D を用いた反応に対し、それぞれ発色液 a~d 0.01ml と 0.65M 水酸化ナトリウム溶液 0.10ml を添加し、555nm の吸光度

を測定した（吸光度 A）。次いでこの反応液にプトレツシン酸化酵素 4.5 単位（50 μ l）を添加し、30℃ で 10 分間反応を続け 555nm の吸光度を測定した（吸光度 B）。その結果は表 - 2 に示される。

表 - 2

発色液	スベルミジン		スベルミン	
	吸光度 A	吸光度 B	吸光度 A	吸光度 B
A - a	0.553	1.108	1.110	1.663
B - b	0.000	0.554	0.000	0.556
C - c	0.556	1.113	1.108	1.664
D - d	0.000	0.555	0.000	0.553

（発色液の調製）

発色液 A : 4 A A 7.5mg を 0.2M リン酸緩衝液（pH7.1）の 100ml に溶解

発色液 B : 4 A A 7.5mg と ベルオキシダーゼ 350 単位を 0.2M リン酸緩衝液（pH7.1）の 100ml に溶解

発色液 C : T O O S 33.7mg を 0.2M リン酸緩衝液 (pH7.1) の 100ml に溶解

発色液 D : T O O S 33.7mg とベルオキシダーゼ 350 単位を 0.2M リン酸緩衝液 (pH7.1) の 100ml に溶解

発色液 a : T O O S 44.5mg とベルオキシダーゼ 350 単位を 10mM リン酸緩衝液 (pH7.0) の 1.0ml に溶解

発色液 b : T O O S 44.5mg を 10mM リン酸緩衝液 (pH7.0) の 1.0ml に溶解

発色液 c : 4 A A 10.0mg とベルオキシダーゼ 350 単位を 10mM リン酸緩衝液 (pH7.0) の 1.0ml に溶解

発色液 d : 4 A A 10.0mg を 10mM リン酸緩衝液 (pH7.0) の 1.0ml に溶解

表-2 より明らかなように B と b すなわち B-b 及び D と d すなわち D-d の組み合わせで反応液中のスベルミン及びスベルミジン量が正確に測定できることがわかった。

すなわち、スベルミジン、スベルミンをポリア

ミン酸化酵素で酸化した時に生成する過酸化水素をベルオキシダーゼの存在下で過酸化水素の測定に用いられる色原体の一方のみと反応することによって消去し、ひきつづき色原体の混合系においてブトレツシン酸化酵素を作用させることによって総ポリアミン量が正確に測定できた。

参考例 8

T O O S 33.7mg、ベルオキシダーゼ 350 単位を 0.2M リン酸緩衝液 (pH7.1) の 100ml に溶解し、発色液 II を調製した。この発色液 1.35ml にスベルミン 10~100 nmol、スベルミジン 10~100 nmol、ブトレツシン 10~100 nmol、カダベリン 10~100 nmol、並びに参考例 6 と同様に調製した試料 A (10μl)、試料 B (10μl) の各試料に蒸留水を添加 (液量: 2.70ml) し、30℃、3 分間予熱した。次にポリアミン酸化酵素 A T-1 0.15 単位 (50μl) を添加し、30℃で 10 分間反応した。この反応液に 4-アミノアンチピリン溶液 (1.0mg/ml) 0.1 ml と 0.65M 水酸化ナトリウム溶液 0.1ml を添加し 555nm の吸光度を測定した (吸光度 A)。

更に続いてこの反応液にブトレツシン酸化酵素 4.5 単位 (50μl) を添加し、30℃で 10 分間反応を続けた後 555nm の吸光度を測定した。その結果は表-3 及び表-4 に示される。

(以下余白)

表 - 3

濃度 (nmol)	ブトレツシン		カダベリン		スベルミジン		スベルミン	
	吸光度 A	吸光度 B	吸光度 A	吸光度 B	吸光度 A	吸光度 B	吸光度 A	吸光度 B
10	0.000	0.056	0.000	0.055	0.000	0.053	0.000	0.057
20	0.000	0.109	0.000	0.108	0.000	0.109	0.000	0.112
40	0.000	0.223	0.000	0.221	0.000	0.222	0.000	0.220
60	0.000	0.335	0.000	0.333	0.000	0.336	0.000	0.334
80	0.000	0.443	0.000	0.445	0.000	0.444	0.000	0.442
100	0.000	0.555	0.000	0.554	0.000	0.556	0.000	0.555

表 - 4

試 料 A (ブトレツシン:カダベリン :スベルミジン:スベルミン =1:1:1:1)		試 料 B (ブトレツシン:カダベリン :スベルミジン:スベルミン =2:2:1:1)	
吸光度A	吸光度B	吸光度A	吸光度B
0.000	0.557	0.000	0.554

すなわち、ポリアミン酸化酵素 A T-1 がスベルミン又はスベルミジンを酸化した時に生成された過酸化水素はいずれも T O O S - ベルオキシダーゼの存在下による反応で除去され、吸光度 B で得られた値は各々の基質の濃度を反映するものであった。従って試料 A、試料 B においてもその総量が測定され、一段目の反応（ポリアミン酸化酵素との反応）によって生ずる過酸化水素を除去し、ブトレツシン酸化酵素を作用させることにより容易に総ポリアミン量を測定できることが示された。

こうして参考例 1 ~ 8 によって明らかなように、各種ポリアミンを含む試料をまずポリアミン酸化

酵素によって処理し、その際生成する過酸化水素をカタラーゼ又はベルオキシダーゼ及び過酸化水素と反応する色原体を添加することによって消去し、しかるのちスベルミジン、ブトレツシン及びカダベリンに作用し、かつスベルミジンからブトレツシンを生成しないアミン酸化酵素を作用させれば試料中の総ポリアミン量が正確に容易に測定できることがわかったのである。

実施例 1

スベルミン、スベルミジン、ブトレツシン、カダベリンの各 10 mM 溶液を 2 : 2 : 1 : 1 の比率で混合して調製した溶液の 25 μ l 又は 50 μ l を血液 5.0 μ l に添加し、3 分間激しく攪拌後、3,000 rpm で 5 分間遠心分離し上澄液を集めた (6.2 μ l)。この上澄液を中和し (pH 6 ~ 7 付近) アンバーライト C G - 50 カラム (0.5 \times 1 cm) に吸着させた。カラムを蒸留水で水洗 (3.0 μ l) 後、0.5M 塩酸 (3.0 μ l) でポリアミン類を溶出し、0.67M 水酸化ナトリウム溶液 (2.0 μ l) を添加し中和した。この中和液を以下の反応の試料として使用した。

発色液 1.35 μ l に上記中和液 1.50 μ l とカタラーゼ 50 単位 (25 μ l) を添加し、30℃ で 3 分間予熱後ポリアミン酸化酵素 A T-1 0.15 単位 (25 μ l) を添加し、更に 10 分間加温した。次に 1.35M 水酸化ナトリウム溶液 (50 μ l) と 60 mM アジ化ナトリウム、0.45 μ g T O O S を含むブトレツシン酸化酵素 4.5 単位 (50 μ l) を添加し、更に 30℃ で 10 分間反応した。反応液の 555 nm の吸光度は次のとおりであった。

無添加	0.053
25 μ l 添加	0.312
50 μ l 添加	0.575

この値より添加回収率を計算すると、25 μ l 添加の場合 100.4%、50 μ l 添加の場合 101.1% と非常に良好であった。

実施例 2

尿 20 μ l に 12N 塩酸 5 μ l を添加し、100℃、3 時間加水分解し、結合型ポリアミンを遊離型ポリアミンとした。(なお加水分解中に生じた沈澱は遠心分離 (5,000 rpm、5 分) で除去し、次いで上澄

液は 10N 水酸化ナトリウム溶液で pH 6 付近に調整後蒸留水を添加し 60 μ l とした。) この中和液をアンバーライト C G - 50 カラム (1 \times 2.5 cm) に吸着させ、カラムは蒸留水 20 μ l、0.5N 塩酸溶液 3 μ l で洗浄した。次にこのカラムより 0.5N 塩酸 10 μ l でポリアミンを溶出し、10N 水酸化ナトリウム溶液で pH 7.5 付近に調整し、蒸留水で 20 μ l とした。この中和液を試料として実施例 1 の反応と同一の操作を行った結果、その 555 nm の吸光度は 0.445 であった。この値は反応液中に 80.1 nmol のポリアミンが存在したことを示す。すなわち尿 1 μ l 中に 53.4 nmol のポリアミンを含むことを示した。又、中和液を 5 倍濃縮し、その 100 μ l を用いてアミノ酸分析計にてポリアミンの測定を行った結果 (測定法は (アグリカルチャル・バイオロジカル・ケミストリー (Agric. Biol. Chem.) 第 44 巻、2467 頁 ~ 2475 頁 (1980)) に従って行った。) 尿中 1 μ l 中に 52.7 nmol のポリアミンを含むことが示され、本方法が化学的分析法と非常によく関連することが示された。